



(43) 國際公開日  
2004 年 5 月 27 日 (27.05.2004)

## PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 2004/044201 A1**

- |   |   |
|---|---|
| (51) 国際特許分類 <sup>7)</sup> :<br>C12N 15/09, 15/12, C07K 14/47,<br>C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 16/18, C12P 21/08,<br>A01K 67/027, C12Q 1/68, 1/02, G01N 33/53 | (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立<br>行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND<br>TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉<br>県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).  |
| (21) 国際出願番号:<br>PCT/JP2003/014475   |   |
| (22) 国際出願日:<br>2003 年 11 月 13 日 (13.11.2003)  | (72) 発明者; および   |
| (25) 国際出願の言語:<br>日本語  | (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ): 審良 静<br>男 (AKIRA, Shizuo) [JP/JP]; 〒569-0036 大阪府<br>高槻市 辻子 1-7-16 Osaka (JP). 竹田 潔<br>(TAKEDA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府 箕<br>面市 小野原東 2-7-10 Osaka (JP). 山本 雅裕<br>(YAMAMOTO, Masahiro) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府<br>箕面市 小野原東 4-19-3 6-205 Osaka (JP). |
| (26) 国際公開の言語:<br>日本語  |   |
| (30) 優先権データ:<br>特願 2002-330972<br>2002 年 11 月 14 日 (14.11.2002) JP<br>特願 2003-270839 2003 年 7 月 3 日 (03.07.2003) JP   |   |

[続葉有]


(54) Title: SIGNALING PROTEINS PARTICIPATING IN IMMUNOPOTENTIATION BY VIRUS-ORIGIN DOUBLE-STRANDED RNA AND ENDOTOXIN AND GENES THEREOF


(54) 発明の名称: ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるシグナル伝達タンパク質及びその遺伝子


**a**

```
TRIF: 395 YNFVILHARAD---EHIALRVREKLEALGVPDGFATCFEDFQVGRGELSCLDAIDHSFA 451
smart00255 TIR: 2 YDVFISYSGDEDVRNEFLSHLLEALRGYKL---CVFIDQFEGGGLENIDAEATEKRSI 57
*: * : : : * : * * * : : * : *
TRIF: 452 IILLTSLNF-DCRLSHQVNMAMSNLNRQSGPDCVIP-.FLPLESSPAQLSSDTASLL- 507
smart00255 TIR: 58 AIVLVSPNYAESEWCLDEL-VAALENALEQGG-LRVIPIFYEVIPSDVRKAPGSRFRKVF 115
*: *: * : : * : : * * * * : : * : :
TRIF: 508 -SGLVRLDEHSQIFARKVANT 527
smart00255 TIR: 116 KNYLKWTEDEKDRFWMKKALYA 136
: * : : * *
```

**b**

TRIF : 712 aa 

MyD88 : 296 aa 

TIRAP/Mal : 235 aa 

**C**

PBL		
肺	A	A...LUNG
胎盤	B	B...PLACENTA
小腸	C	C...SMALL INTESTINE
肝臓	D	D...LIVER
腎臓	E	E...KIDNEY
脾臓	F	F...SPLEEN
胸腺	G	G...THYMUS GLAND
大腸 (粘膜なし) H		H...LARGE INTESTINE (WITHOUT MUCOSA)
骨格筋 I		I...SKELETAL MUSCLE
心臓 J		J...HEART
脳 K		K...BRAIN

**(57) Abstract:** It is intended to provide proteins having an interferon-induced signaling activity and participating in immunopotentialiation by a virus-origin double-stranded RNA and an endotoxin, genes thereof, and method of using the same. Namely, DNA' s (SEQ ID NOS:1 and 3) encoding proteins having an interferon-induced signaling activity and participating in immunopotentialiation by a virus-origin double-stranded RNA and an endotoxin, and proteins (SEQ ID NOS: 2 and 4) having an interferon-induced signaling activity expressed by these DNA' s. Mutant DNA' s and mutant proteins derived from the above DNA' s and proteins; antibodies specifically binding to the above proteins; nonhuman animals lacking the above genes on chromosome; and a method of judging immunopotentialiation ability of cells and a method of screening an interferon-induced signaling substance using such an antibody, e nonhuman animal and a gene probe.

**BEST AVAILABLE COPY**

[続葉有]

## 明 細 書

ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるシグナル伝達タンパク質及びその遺伝子

5

## 技術分野

本発明は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質、その遺伝子、及びその利用に関する。

10

## 背景技術

生体は、常に微生物の侵入等の危機に曝されている。このような危機に対する生体防御は、自然免疫と獲得免疫の協調作用により確立される。自然免疫を担当するマクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞は、  
15 Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる一群の膜タンパク質を介して、病原体を認識する。この認識により活性化された抗原提示細胞は、IL-12、TNFなどの炎症性サイトカインを産生すると同時に、CD40などの補助機能分子の発現を増強する。補助機能分子の発現は、抗原提示細胞と協同して、獲得免疫を担当するT細胞の増殖を誘導する。また、IL-12は、ナイーブT細胞やインターフェロン(IFN)を産  
20 生する1型ヘルパーT(Th1)細胞へと分化誘導し、細胞性免疫を確立させる。したがって、TLRを介したシグナルは、獲得免疫を量的、質的、双方の面から制御していることになる。

TLRは、病原体のような微生物の特有の成分を認識するレセプター  
25 であるが、TLRには多くのファミリーがあることが確認されている。即ち、TLRレセプターファミリーは、微生物の構成成分のそれぞれ特

いる (Nat. Immunol 2, 675, 2001)。事実、TLR 4 シグナルは、MyD 8 8 依存経路と非依存的経路の両方を含んでいる。前者はサイトカインの産生に必須であり、後者はIRF-3の活性化と、その後のインターフェロン $\beta$  (interferon-beta: IFN- $\beta$ ) 及びIFN-誘導 (IFN-inducible) 遺伝子 (J. Immunol. 167, 5887, 2001, Nat. Immunol. 3, 392, 2002, Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature in press, 2002) の誘導に  
5 関与している。更に、MyD-8 8 非依存的経路は樹状細胞 (DCs) を機能的に成熟させている (J. Immunol. 166, 5688, 2001)。MyD-  
10 8 8 非依存的経路はTLR 3 シグナルでも観察されている (Nature 413, 732, 2001)。

近年、TIRAP/Ma1がTIR領域に隠れている二番目のアダプター分子として発見された (Nat. Immunol. 2, 835, 2001, Nature 413, 78, 2001)。インビトロでの研究においては、TIRAP/Ma1がMy  
15 D-8 8 非依存的経路でのLPS誘導による活性化に関与していることを示唆している (Nat. Immunol. 2, 835, 2001)。しかしながら、TIRAP欠損マウスにおける研究でTIRAPがTLR 2 とTLR 4 経由のMyD-8 8 非依存的シグナル経路内でアダプターとして機能していることが明らかになった (Essential role for TIRAP in activation of the  
20 signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature in press, 2002)。これらの研究は、TIRを含むいくつかのアダプター分子がTLRを介したシグナル経路に関与し、これらのアダプターの異なる使用がTLRシグナルの特異性をもたらし、さらにMyD-8 8 非依存的経路がTIRAP以外の分子によって介されていることを示唆している。

25 一方、細菌感染を防御する機構に関与するタンパク質及びその遺伝子に関する開示としては、TLR 4 分子を介したNF- $\kappa$ B活性化の増加

存しないシグナルの存在が示唆された。

ウイルス由来の二重鎖RNAを認識するTLR3を介したシグナルでも、インターフェロン誘導性遺伝子の発現が誘導されることから、TLR4を介したMyD88、TIRAP非依存性のシグナルとTLR3を介したシグナルには共通の分子の関与が示唆された。そこで、MyD88及びTIRAPと同様にTIRドメインを有する分子を検索した結果、TIRドメインを有する遺伝子TRIF (TIR domain containing adaptor inducing interferon-beta) を見い出した。この遺伝子はヒトではコーディング領域 (coding region) が2,136bpで、712のアミノ酸をコードする。マウスでは、2,199bpで、733アミノ酸をコードしている。ヒト、マウスともに、TIRドメインがタンパク質の中央部分に存在している (第2図)。

293細胞 (human embryonic kidney cell) に、インターフェロン $\beta$  (IFN-beta) の遺伝子プロモーター下にルシフェラーゼ (luciferase) を組み込んだプラスミド (plasmid) とともに導入して、この遺伝子を発現させるとルシフェラーゼ活性化を増強した。この結果は、該遺伝子によりコードされるタンパク質が、インターフェロン $\beta$ の発現に関与していることを示している。MyD88、TIRAPを発現させてもインターフェロン $\beta$ 遺伝子のプロモーターは活性化されないことから、TIRドメインを有するタンパク質のなかでも、該遺伝子によりコードされるタンパク質がインターフェロンの誘導シグナルに特異的に関与していることを示していた。TIRドメインだけにした本遺伝子によりコードされるタンパク質の変異タンパク質では、本遺伝子によりコードされるタンパク質全長の導入によるインターフェロン $\beta$ の遺伝子プロモーターの活性化をブロックするドミナントネガティブ (dominant negative: 抑制) 効果を有する。

- るタンパク質をコードするDNA（請求項1）や、インターフェロン誘導シグナル伝達活性が、インターフェロン $\beta$ の誘導シグナル伝達活性であることを特徴とする請求項1記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項2）や、配列表
- 5 の配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項1又は2記載のDNA（請求項3）や、配列表の配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項1又は2記載のDNA（請求項4）や、請求項3又は4記載の遺
- 10 伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項1又は2記載のDNA（請求項5）や、インターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質が、以下の（a）又は（b）のタンパク質であることを特徴とする請求項1又は2記載のDNA、即ち、（a）配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は、（b）配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列
- 15 において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質（請求項6）や、インターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質が、以下の（a）又は（b）のタンパク質である
- 20 ことを特徴とする請求項1又は2記載のDNA、即ち、（a）配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は、（b）配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質（請求項7）
- 25 や、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質（請求

子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物(請求項19)や、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項1～7のいずれか記載のDNAを導入することを特徴とするインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を発現する細胞の調製方法(請求項20)からなる。

さらに本発明は、請求項1～7のいずれか記載のDNA又はその部分からなることを特徴とする、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子検出用プローブ(請求項21)や、請求項21記載の遺伝子検出用プローブを用いて遺伝子を検出し、判定することを特徴とする細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活機能の判定方法(請求項22)や、請求項16又は17記載の抗体を用いて、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の発現状態を検出することを特徴とする、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活機能の判定方法(請求項23)や、請求項18記載のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に、被検物質を投与し、該非ヒト動物のインターフェロン誘導活性を測定・評価することを特徴とする、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニング方法(請求項24)からなる。

について示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子からなる。該遺伝子は、配列表の配列番号1又は配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNAからなる。本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性としては、インターフェロン $\beta$ の誘導シグナル伝達活性が挙げられる。

また、本発明は、次の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA；  
(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質、からなる変異遺伝子を含む。該変異遺伝子を取得するには、本発明の配列表の遺伝子配列情報により、適宜公知の遺伝子工学の手法により変異させて、取得することができる。

更に、本発明は本発明の遺伝子（配列表の配列番号1又は配列番号3のDNA）とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードするDNA、すなわち、インタクトな遺伝子の変異体を含む。該遺伝子を取得するには、例えば、配列表の配列番号1又は配列番号3に示される塩基配列からDNAプローブを作製し、該DNAプローブを用いて、DNAライブラリーに対し

活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質は、本発明の遺伝子を用いて、遺伝子工学的に公知の方法により、製造することができる。即ち、本発明の遺伝子を、本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を発現するための発現ベクターに組み込み、該組換えベクターを宿主細胞へ導入し、形質転換させて、該細胞を培養することにより、遺伝子を発現させて、本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を製造することができる。

上記本発明のタンパク質の遺伝子工学的製造に用いる発現系としては、  
10 該本発明のタンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソード及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、  
15 バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

20 また、上記本発明のタンパク質の遺伝子工学的製造に用いる、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラ S 2、スポドプテラ S f 9 等の昆虫細胞や、L 細胞、CHO 細胞、COS 細胞、HeLa 細胞、C127 細胞、BAL  
25 B/c3T3 細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21 細胞、HEK293 細胞、Bow



の方法を用いることができる。

本発明は、更に、染色体上で本発明のウイルス由来二重鎖RNA及び  
エンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル  
伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能を欠損させ、該遺  
5 伝子機能の欠損したノックアウト非ヒト動物を含む。該非ヒト動物を作  
製するには、配列表の配列番号2又は配列番号4に示されるアミノ酸配  
列において、その一部のアミノ酸を他のアミノ酸に変換したアミノ酸配  
列をコードする遺伝子を導入することにより、インターフェロン誘導シ  
グナル伝達活性タンパク質をコードする遺伝子機能を欠損させて行うこ  
10 とができる。また、動物遺伝子の、配列表の配列番号2又は配列番号4  
に示されるアミノ酸配列において、その一部のアミノ酸配列に相当する  
部分を欠失させ、インターフェロン誘導シグナル伝達活性タンパク質を  
コードする遺伝子機能を欠損させて行うことができる。本発明における  
非ヒト動物としては、トリ、ウサギ、マウス、ラット等の非ヒト動物を  
15 具体的に挙げることができるが、実験用として用いる目的からは、マウ  
スが特に好ましい。本発明のインターフェロン誘導シグナル伝達活性タ  
ンパク質をコードする遺伝子機能を欠損した非ヒト動物の作製に際して、  
遺伝子を導入する方法としては、ターゲティングベクターの構築等公知  
の適宜の方法を用いることができる。

20 本発明においては、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンに  
よる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有する  
タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、本発  
明の遺伝子(DNA)を導入することによって細胞機能を修復し、イン  
ターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質を発現する細胞  
25 を調製することができる。

また、本発明の遺伝子(DNA)又はその部分からなるDNA配列を

- に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニングを行うことができる。該インターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニングには、被検物質を非ヒト動物に投与し、該非ヒト動物の、例えばインターフェロン $\beta$ のようなインターフェロン誘導活性を測定・
- 5 評価することにより行うことができる。該インターフェロン誘導シグナル伝達活性物質は、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質の機能又は発現に関連する疾病の治療に用いることができる。
- 10 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 実施例 1

- この実施例では、TLRを経たシグナル伝達経路を更に明らかにするために、MyD88とTIRAP以外のTIR領域を含むアダプター分子を検索し、データベースによるスクリーニングによりTRIF（インターフェロン $\beta$ （interferon-beta）を誘導するTIR領域を含むアダプター）と名づけた新規のアダプター分子を同定した。この実験により、TRIFがMyD88或いはTIRAPではなく、IFN $\beta$ のプロモーター及びTRIFのドミナントネガティブ（抑制）型を優位的に活性化し、ポリ（I：C）に介されたTLR3反応を阻害することから、この新規アダプターがTLR3シグナルにおける特異的な役割をもつことを確認した。
- 15
- 20

#### 25 [遺伝子の同定と機能の解明]

##### 材料と方法

- expressed sequence tag (E S T) データベース上で検索し、新規のヒト cDNA クローン (アクセッション番号: B C 0 0 9 8 6 0、配列番号 1) を同定し、T R I F と命名した。この遺伝子は N C B I に登録されている T I R 領域 (s m a r t 0 0 2 5 5 T I R) と非常に類似していた (第 1 図 a)。この断片をプローブとして、この遺伝子の完全長 cDNA を同定した。M y D 8 8 (296 アミノ酸をコード) と T I R A P / M a 1 (235 アミノ酸) と比較すると、この遺伝子には 2136 bp の長いオープンリーディングフレームがあり、712 アミノ酸 (配列番号 2) をコードしていた (第 1 図 b)。
- 10 このヒト T R I F アミノ酸配列がコードされた cDNA は未知の機能のマウス T R I F cDNA クローン (アクセッション番号: X M 1 1 0 2 4 4、配列番号 3) と 55% の相同性を示した。この遺伝子産物を T R I F、即ち I F N -  $\beta$  を誘導するアダプターを含む T I R 領域とした (第 2 図)。
- 15 T R I F の T I R 領域は、T R I F タンパク質の C 末端側に存在した。また、T L R 中に保存され T L R を介したシグナルの活性に必須なプロリン残基がみられた (第 1 図 a) (Science 282, 2085, 1998; J. Immunol. 162, 374, 1999; Nature 401, 811, 1999)。T R I F の発現を、ヒトの組織から抽出した全 RNA を用いてノーザンハイブリダイゼーションにより解析した。プローブとして、ヒト T R I F cDNA の 678 ~ 1481 番目の cDNA 断片を、[<sup>32</sup>P] - d C T P でメガプライム DNA ラベリングキット (Amersham 社製) を用いてラベルし、human MTN blot (Clontech 社製) の ExpressHyb solution (Clontech 社製) 10 ml で 65℃、12 時間ハイブリダイズを行った後、2×SSC、0.1% SDS で 65℃で 30 分、0.1% SDS を含む 0.2×SSC で 65℃、30 分洗浄し、BioMax MS フィルム (KODAK 社製) で現像を行った。その
- 20
- 25

の、ルシフェラーゼ活性を誘導した（第3図c、左）。I F N -  $\beta$  プロモーター由来ルシフェラーゼ遺伝子の場合、 $\Delta C$ は全長T R I Fによる誘導と同程度のプロモーター活性が認められたが、 $\Delta N$ では認められなかった（第3図c、右）。 $\Delta N \Delta C$ においては、ルシフェラーゼレポーター

5 プロモーターの活性は認められなかった。これらの結果により、T R I Fの明確な領域が次に挙げる2種類のプロモーターの活性化の原因となること、即ち、T R I FのN末端の一部分はI F N -  $\beta$  プロモーター活性に必須であり、T R I FのN末端とC末端双方の一部分はN F -  $\kappa$  Bの活性化に関与している、ということが示唆された。

10

（T R I F抑制型のT L R経由シグナル伝達経路への影響）

M y D 8 8及びT I R A Pの場合と同様に、T R I FのT I R領域( $\Delta N \Delta C$ )の発現はドミナント阻害因子 (dominant inhibitor) として作用した。全長T R I Fが誘導したN F -  $\kappa$  B及びI F N -  $\beta$  プロモーターの活性化はT R I F  $\Delta N \Delta C$ の発現により顕著に抑制された（第4図

15 a）。T R I F  $\Delta N \Delta C$ を用いて、T R I FがT L R依存性シグナル伝達経路であるかどうかを解析した。2 9 3細胞におけるT L R 4 / M D - 2の発現は、この細胞がL P Sに応答してN F -  $\kappa$  Bレポーターを活性化することを可能にした。T R I F  $\Delta N \Delta C$ の共発現は、T L R 4 - に

20 依存したN F -  $\kappa$  Bの活性化を阻害 (inhibit) した（第4図b）。さらに、T L R - 2及びT L R - 7に依存したN F -  $\kappa$  Bの活性化は、T R I F  $\Delta N \Delta C$ の発現により抑制 (prohibit) された（第4図c、d）。M y D 8 8及びT I R A Pの強制発現は、N F -  $\kappa$  Bのリガンド非依存的な活性化をもたらした。T R I F  $\Delta N \Delta C$ の共発現は、M y D 8 8及び

25 T I R A Pを介したN F -  $\kappa$  Bの活性化を顕著に阻害した（第4図e、f）。これらの結果により、T R I FがM y D 8 8及びT I R A Pの下流

－T R I F (M y c がタグされたT R I F :Myc-tagged TRIF)をトランスフェクションし、一過性発現させた。m o c k (対照)群においては、空のベクターを10  $\mu$  gトランスフェクションしたものを用いた。トランスフェクションの36時間後、細胞を0.15%NP-40、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、10%グリセロール、10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸塩、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、及びプロテアーゼ阻害剤(混合物は Roche Diagnostics 社製)を含む溶菌バッファー中で溶解した。

細胞溶解液を Protein G-sepharose (Amersham 社製)を用いて前精製を1時間行い、次に2  $\mu$  gの抗F l a g M 2抗体(anti-Flag M2 antibody: Sigma 社製)、2  $\mu$  gの抗M y c P L 1 4抗体(anti-Myc PL14 antibody: M B L 社製)もしくは1  $\mu$  gの抗ヒトI R F - 3抗体(anti-human IRF-3 antibody: SantaCruz 社製)及び Protein G-sepharose (Amersham 社製)で2時間免疫沈降を行った(第5図a)。

免疫沈降物を、溶解バッファーで洗浄した後、SDSサンプルバッファーに溶解し、SDS-PAGEにより分子量別に分離し、ポリフッ化ビニリデン(P V D F)膜(BIO-RAD 社製)に移した。Flag-Taggedタンパク質及びMyc-Taggedタンパク質は、それぞれHRP標識抗F l a g M 2抗体もしくはHRP標識抗M y c 9 E 1 0抗体(SantaCruz 社製)とそれぞれ反応させた。内因性のI R F - 3は抗ヒトI R F - 3抗体及びHRP標識抗ウサギI g G抗体(Amersham 社製)と反応させ、抗体によって認識されたバンドをECLシステム(PerkinElmer Life Sciences 社製)により検出した。

既に報告したとおり、M y D 8 8及びT I R A PのT I R領域はT L Rとの相互作用に必須である。そこで、T R I FのT I R領域( $\Delta$ N $\Delta$ C)がT L R 3を認識するかどうかを解析した。F l a g - T L R 3を

べき点は、T R I F の抑制型は、M y D 8 8 或いはT I R A Pではなく、完全にT L R 3を介したシグナルを阻害したことである。このことは、T L R 3シグナルにおけるT R I Fの特異的な役割を示している。さらに、T R I Fの抑制型は、T L R 2、T L R 4、或いはT L R 7を介したN F -  $\kappa$  B活性を阻害することから、他のT L Rシグナル経路において何らかの役割が存在することが示唆される。それぞれのT L R応答におけるT R I Fの機能的役割がノックアウトマウスの発生の過程で観察されたとしても、T R I Fが優位的にI F N -  $\beta$ プロモーターを活性化させ、T R I FがI R F - 3と認識するということは、T R I FがT L R 3シグナルのM y D 8 8非依存的経路においてT R I Fが関与していることを示している。

## 実施例 2

Toll-like receptor (T L R) の刺激は、炎症性サイトカインの産出を導く共通のM y D 8 8依存経路、及びI F N -  $\beta$ の生成を導き、T L R 3及びT L R 4シグナルに独特のM y D 8 8非依存経路の活性化を誘因する。本実施例で、本発明者は、T I Rドメインを含むアダプター、T R I Fをコードする遺伝子を破壊し、T R I F欠損マウスを作製して、T R I FのT L Rを経たシグナル伝達経路における役割について更に明らかにした。

すなわち、T R I F欠損マウスには、T L R 3及びT L R 4を介したI F N -  $\beta$ の発現及びI R F - 3の活性化に欠陥があった。更に、T L R 4を介した、炎症性サイトカインの産出が、T R I F欠損マクロファージで、消失していた。M y D 8 8及びT R I Fの両方が欠損したマウスでは、T L R 4刺激に応答したN F -  $\kappa$  Bの活性化が完全に喪失していた。これらの結果は、T R I Fが、T L R 3及びT L R 4を介したシ

社から購入した。免疫沈降又は免疫ブロット用に、T R I F マウスのアミノ酸 6 7 2 - 6 8 4 又は 7 1 8 - 7 3 2 に対するポリクロナール抗 T R I F 抗体を、それぞれ産出した。I F R - 3 マウスのアミノ酸 1 3 1 - 1 4 4 に対するポリクロナール抗 I R F 3 抗体を産出した。F A C S 5 分析を行った抗 I g M 抗体は、Jackson ImmunoResearch Laboratory から購入した。

(電気泳動度シフト法)

胎児の繊維芽細胞及び肺繊維芽細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の L P S、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のポリ (I : C) 及び  $10 \text{ ng}/\text{ml}$  T N F -  $\alpha$  で、示された時間刺激した。細胞から核抽出物を精製し、N F -  $\kappa$  B D N A 結合部位用の特異のプロープとインキュベートし、電気泳動し、文献記載に準じて、オートラジオグラフィで視覚化した (Immunity 9:143, 1998)。

15

(炎症誘発性サイトカイン濃度の測定)

9 6 well plate で、P G N、L P S、R - 8 4 8 又は C p G D N A の示された濃度で、チオグリコール酸が誘出した腹腔マクロファージを培養した (well 毎に  $5 \times 10^4$  細胞)。腹腔マクロファージが産出した T N F -  $\alpha$ 、I L - 6、I L - 1 2 p 4 0 を、製造者の指示に従って、E L I S A で測定した (Genzyme 社製)。

20

(B 細胞増殖分析)

9 6 well plate で、ポリ (I : C)、L P S、R - 8 4 8 又は C p G D N A の示された濃度で、2 4 時間脾細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を培養した。1 25 マイクロキュリーの [ $^3\text{H}$ ] チミジンを、後半の 1 2 時間パルスし、次

懸濁液に、冷えた完全DMEM培地を加えた。遠心分離（1100rpm、5分間）した後、ペレットを完全培地に再び懸濁し、その後皿で培養した。切除から10日で、肺繊維芽細胞を各実験に使用した。

5 (Native-PAGE分析：非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

肺繊維芽細胞（ $1 \times 10^6$ ）及び腹腔マクロファージ（ $5 \times 10^6$ ）を、それぞれ50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリ（I:C）及び1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSで、示された期間刺激し、その後溶解した。native-PAGEサンプル緩衝液内の細胞溶解物（62.5mMのTris-Cl、pH6.8、15%のグリセロール及び1%のデオキシコラーテ）を、native-PAGEで単離し、その後文献記載に準じて、抗IRF-3抗体で免疫ブロットした（Int. Immunol. 14, 783, 2002）。

10

[実験結果と考察]

15 Toll-like receptor (TLR) は、微生物の構成成分の特異なパターンを認識し、MyD88、TIRAP及びTRIF等のToll/IL-1レセプター（TIR）ドメインを有するアダプターを経由した、シグナル伝達経路の活性化を通じて、自然免疫反応を誘発する（Annu. Rev. Immunol. 20:197, 2002; Annu. Rev. Immunol. 21:335, 2003）。MyD88は、全てのTLRに共通のアダプターであるが、TIRAPはTLR2及びTLR4を介したシグナル経路に特異的に関与している（Nat. Immunol. 2, 675, 2001、Nature 420, 324, 2002、Nature 420, 329, 2002）。共通のMyD88依存経路に加えて、TLR3及びTLR4は、IRF-3の活性化とIFN- $\beta$ の誘導を導くMyD88非依存経路を使用し

20

25

ている（J. Immunol. 167, 5887, 2001、Int. Immunol. 14, 1225, 2002、Immunity 17, 251, 2002）。IFN- $\beta$ を誘導するTIRドメインを有す



応答した（第7図B）。T R I F<sup>-/-</sup>B細胞は、ポリ（I：C）誘導性の、  
 C D 6 9、C D 8 6及びM H CクラスIIの細胞表面上の発現の増加に著  
 しい欠陥があったが、抗I g M A b抗体誘導性では障害はなかった（第  
 7図C）。したがって、T R I F<sup>-/-</sup>マウス及びT L R 3<sup>-/-</sup>マウスは、  
 5 ポリ（I：C）に対する応答に欠陥があり、T R I Fが、T L R 3を介し  
 たシグナル経路に必須であることを示唆した。

TLR3リガンドに加えて、TLR4リガンドLPSが、IFN- $\beta$ 及びIFN誘導性遺伝子の発現をMyD88非依存性に誘導することを示した(J. Immunol. 167, 5887, 2001、Int. Immunol. 14, 1225, 2002、Immunity 17, 251, 2002)。本発明者らは、胎児の繊維芽細胞におけるLPS刺激で誘導されるRANTES、IP-10及びMCP-1などのIFN誘導性遺伝子のmRNAを分析した(第8図A)。TRIF<sup>-/-</sup>細胞では、LPSが誘導するIFN誘導性遺伝子の発現は著しく減少した。したがって、TRIF<sup>-/-</sup>マウスは、LPSに対するMyD88非依存的応答に欠陥があった。

次に、MyD88依存性で誘導される、幾つかのTLRリガンドに  
 20 答した、炎症性サイトカインの産出を分析した（第8図B）。野生型及び  
 TRIF<sup>-/-</sup>のマクロファージは、両方とも、TLR2リガンドペプチ  
 ドグリカン、TLR7リガンドR-848及びTLR9リガンドCpG  
 DNAに応答して、同程度のレベルのIL-12p40を生成した。

しかし、LPSが誘導するTNF- $\alpha$ 、IL-6、及びIL-12p40の生成は、TRIF<sup>-/-</sup>マクロファージでは、消失した(第8図B、C)。さらに、TRIF<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞は、R-848に応答して、通常通り増殖するにもかかわらず、LPSに応答した増殖では著しい欠陥を示した(第8図D)。さらに、LPSが誘導するCD69及びCD89発現の増加は、TRIF<sup>-/-</sup>B細胞では、抗IgM A b抗体が誘導

- K活性化の欠陥が、 $TRIF^{-/-}$ マウスのMyD88依存性の早期活性化により遮蔽されていると仮定し、 $TRIF$ 及びMyD88の両方が欠損したマウスを作製した。 $TRIF/MyD88$ ダブルノックアウトマウスの胎児繊維芽細胞では、LPSが誘導するNF- $\kappa$ B及びJNKの
- 5 活性化が完全に消失していた（第9図E）。更に、例えばIP-10、MCP-1及びRANTESなどのIFN誘導性遺伝子のLPSによる誘導は、 $TRIF/MyD88$ ダブルノックアウト細胞では全く観察されなかった（第9図F）。これらの観察結果は、TLR4が介するMyD88非依存性経路の活性化に、 $TRIF$ が必須であることを明確に示した。
- 10 本発明者は、 $TRIF^{-/-}$ マウスの分析で明らかになった $TRIF$ の生理学的機能を報告する。 $TRIF^{-/-}$ マウスは、TLR3及びTLR4リガンドが誘導するMyD88非依存性の応答において、著しい欠陥があった。 $TRIF^{-/-}$ マウスでは、すべてのポリ（I：C）誘導性応答が消失していたので、 $TRIF$ は、TLR3シグナル経路では、TLR3シグナリングに必須のアダプターである。TLR4刺激では、 $TRIF^{-/-}$ マウスは通常のLPS誘導性MyD88依存性NF- $\kappa$ B及びMAPキナーゼ活性化を示したにもかかわらず、LPS誘導性の炎症性サイトカインの産出には欠陥があった。MyD88及びTIRAPは、TLR4シグナル経路において、重要な役割を持つことが示された。
- 15 本発明者の観察結果は、恐らくTLR4とこれら3つ（又はそれ以上）のTIRドメインを有するアダプターとの大きな複合体の形成を通じて、 $TRIF$ が、MyD88依存経路にも関与していることを示唆した。IFN- $\beta$ プロモーターの活性化にはN末端部分だけが関与していたが、NF- $\kappa$ B活性化は、 $TRIF$ のN末端及びC末端部分の両方が誘導されることを示された（J. Immunol. 169, 6668, 2002）。したがって、 $TRIF$ のC末端部分は、TLR4シグナリングのMyD88依存経路に
- 20
- 25

す図である。

(A) 腹腔マクロファージを、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のポリ(I:C)で、示された時間刺激した。全RNA ( $5 \mu\text{g}$ )を抽出し、IPN- $\beta$ 、IP-10、RANTES及びMCP-1の発現を調べるために、ノーザン  
5 ブロット分析を行った。同じ細胞膜を、 $\beta$ -アクチンプローブで再度ハイブリダイズした。

(B) ポリ(I:C)又はCpG DNAで刺激した脾細胞の増殖。ポリ(I:C)又はCpG DNAの示された濃度で、脾細胞を24時間培養した。 $[^3\text{H}]$ チミジン ( $1 \mu\text{Ci}$ )を後半の12時間パルスした。  
10  $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みを、シンチレーション計数器(Packard社製)で測定した。

(C) 脾臓B220+細胞を、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のポリ(I:C)又は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗IgM抗体と共に培養した。36時間の培養後、細胞を収集し、ビオチン共役抗CD69抗体若しくは抗CD86抗体で、又は  
15 抗I-A<sup>b</sup>抗体に続いてストレプトアビジンPEで染色した。Cell Quest softwareを使用して、FACS Caliburで染色した細胞を分析した。

第8図は、TRIF欠損細胞内のLPSに対する応答の欠陥について示す図である。

20 (A) 胎児の繊維芽細胞を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSで、示された時間刺激した。全RNA ( $10 \mu\text{g}$ )を抽出し、IP-10、RANTES及びMCP-1の発現を調べるために、ノーザンブロット分析を行った。同じ組織膜を $\beta$ -アクチンプローブで再度ハイブリダイズした。

(B) TRIF欠損マウス又は野生型のマウスからの腹腔マクロファージを、刺激しない状態にしたか、又は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドグリカン(PGN)、 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ のLPS、 $100 \text{ nM}$ のR-848、3  
25

製し、NF- $\kappa$ B特異プローブを使用して、EMSAで、NF- $\kappa$ B DNA結合活性化を測定した。矢印及び米印は、誘導されたNF- $\kappa$ B複合体及び非特異バンドを、それぞれ示している（上パネル）。細胞抽出物に対する抗 phospho JNK特異抗体を使用して、LPS刺激細胞のJNK活性化を、ウエスタンブロット法で、測定した（下パネル）。（F）野生型及びTRIF/MyD88DKOマウスの胎児の繊維芽細胞を、10  $\mu$ g/mlのLPSで、示された時間刺激した。全RNA（10  $\mu$ g）を抽出し、IP-10、RANTES及びMCP-1の発現を調べるために、ノーザンブロット法で分析した。同じ細胞膜を $\beta$ -アクチンプローブで、再度ハイブリダイズした。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、生物の微生物の侵入に対する生体防御機構に関与する、ウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質、及び該タンパク質をコードする遺伝子を取得し、同定したことにより、本発明が、ウイルス感染によるインターフェロン誘導の分子機構の解明に大きく貢献できることのみならず、該ウイルス由来二重鎖RNAによる免疫賦活機構に関わる疾病の診断や該疾病を治療する治療薬の創出に有力な手段を提供することができる。

は 2 記載の DNA。

(a) 配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からな

5 り、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質

8. ウイルス由来二重鎖 RNA 及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質。

9. インターフェロン誘導シグナル伝達活性が、インターフェロン  $\beta$  の誘導シグナル伝達活性であることを特徴とする請求項 8 記載のインター

10 フェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質。

10. 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のタンパク質。

11. 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からな

15 り、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質。

12. 配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のタンパク質。

13. 配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からな

20 り、かつインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質。

14. 請求項 1～7 のいずれか記載の DNA を、発現用ベクターに組込んだことを特徴とするインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質発現組換えベクター。

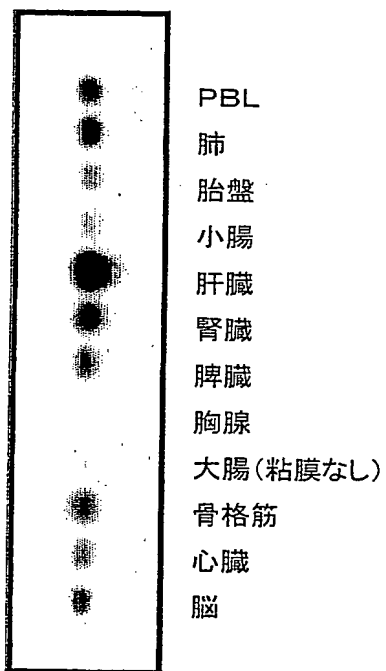
15. 請求項 14 記載のインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質発現組換えベクターを宿主細胞へ導入したことを特徴とする形質転換細胞。

よる免疫賦活機能の判定方法。

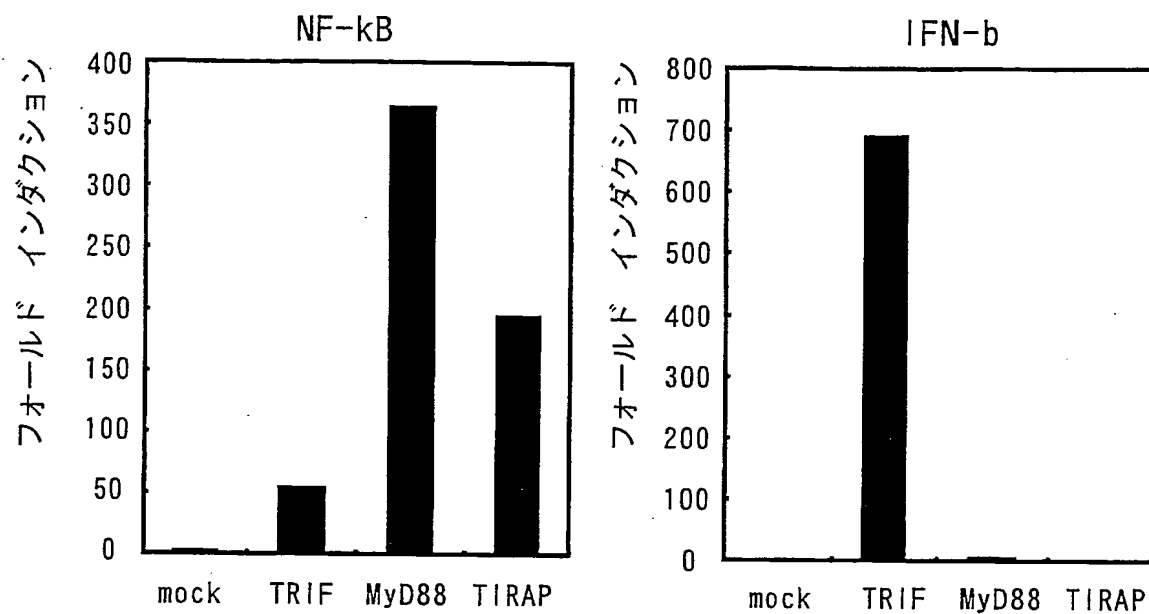
24. 請求項18記載のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物
- 5 に、被検物質を投与し、該非ヒト動物のインターフェロン誘導活性を測定・評価することを特徴とする、細胞のウイルス由来二重鎖RNA及びエンドトキシンによる免疫賦活に関わるインターフェロン誘導シグナル伝達活性物質のスクリーニング方法。

第 1 図 (つづき)

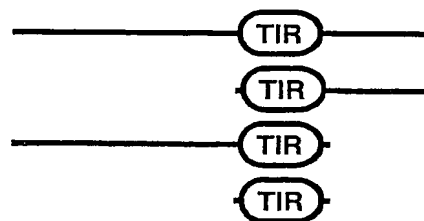
C



## 第 3 図

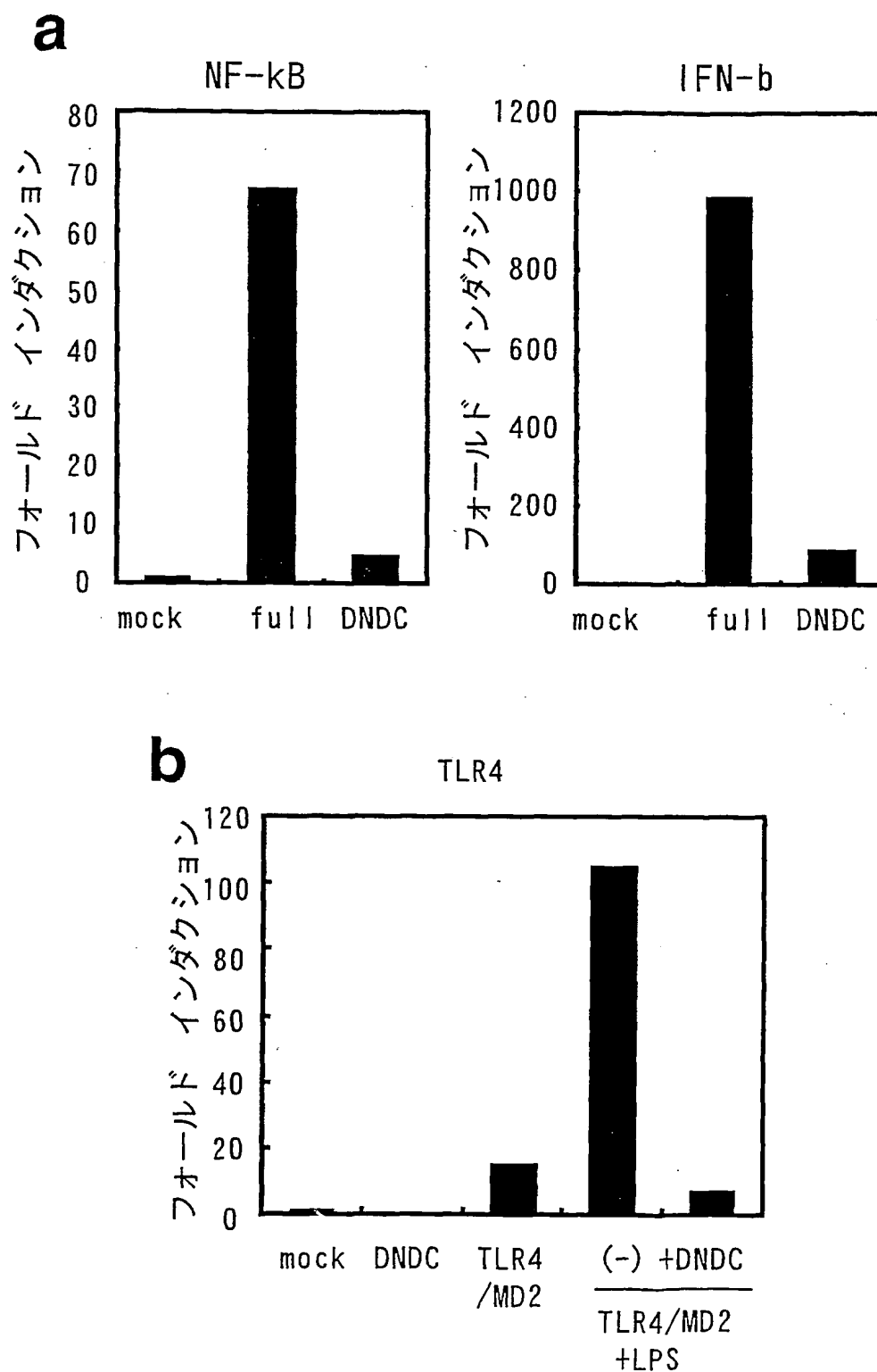
**a****b**

full : 712 aa  
 $\Delta$ N : 333 aa  
 $\Delta$ C : 541 aa  
 $\Delta$ N  $\Delta$ C : 162 aa

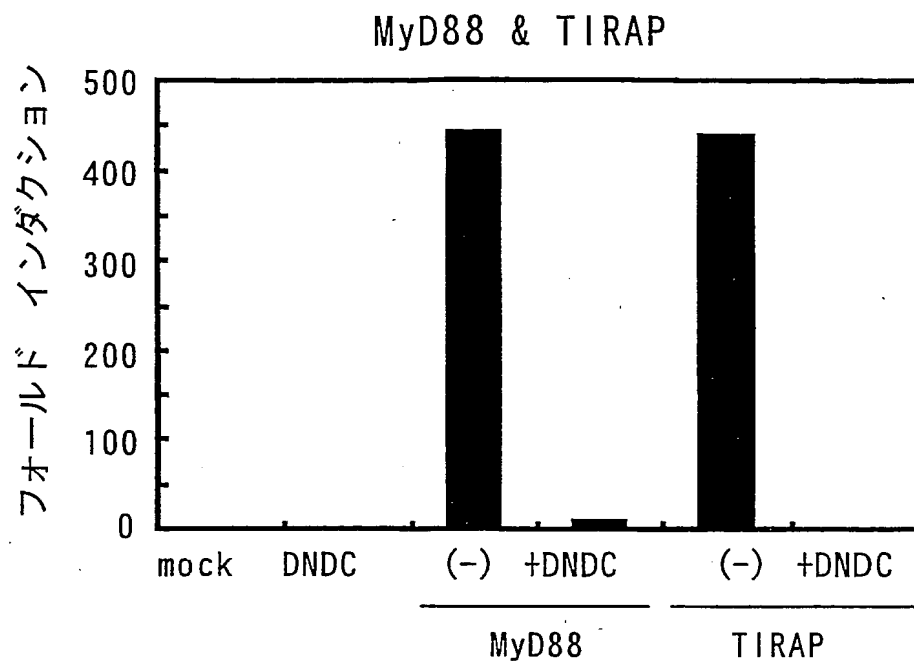
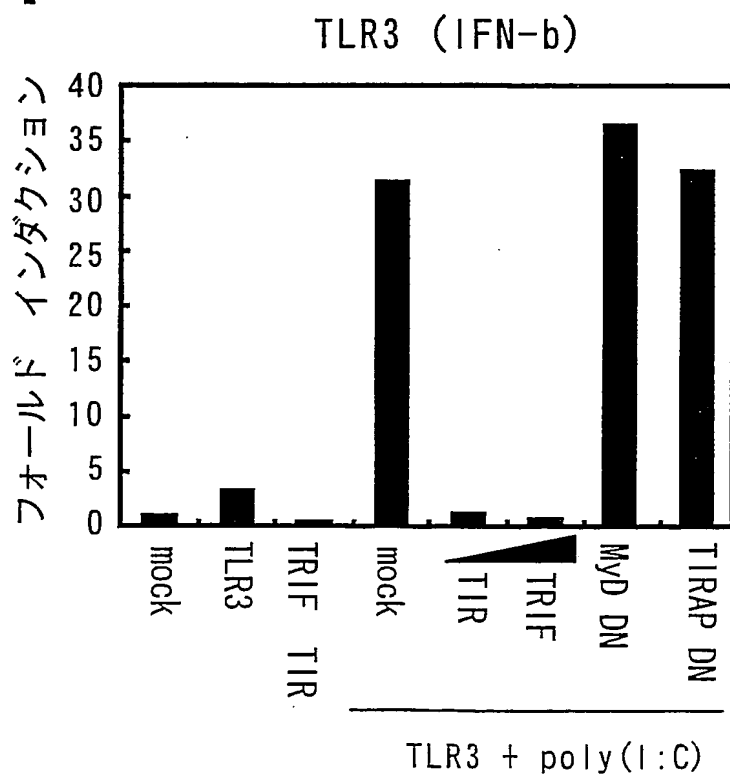




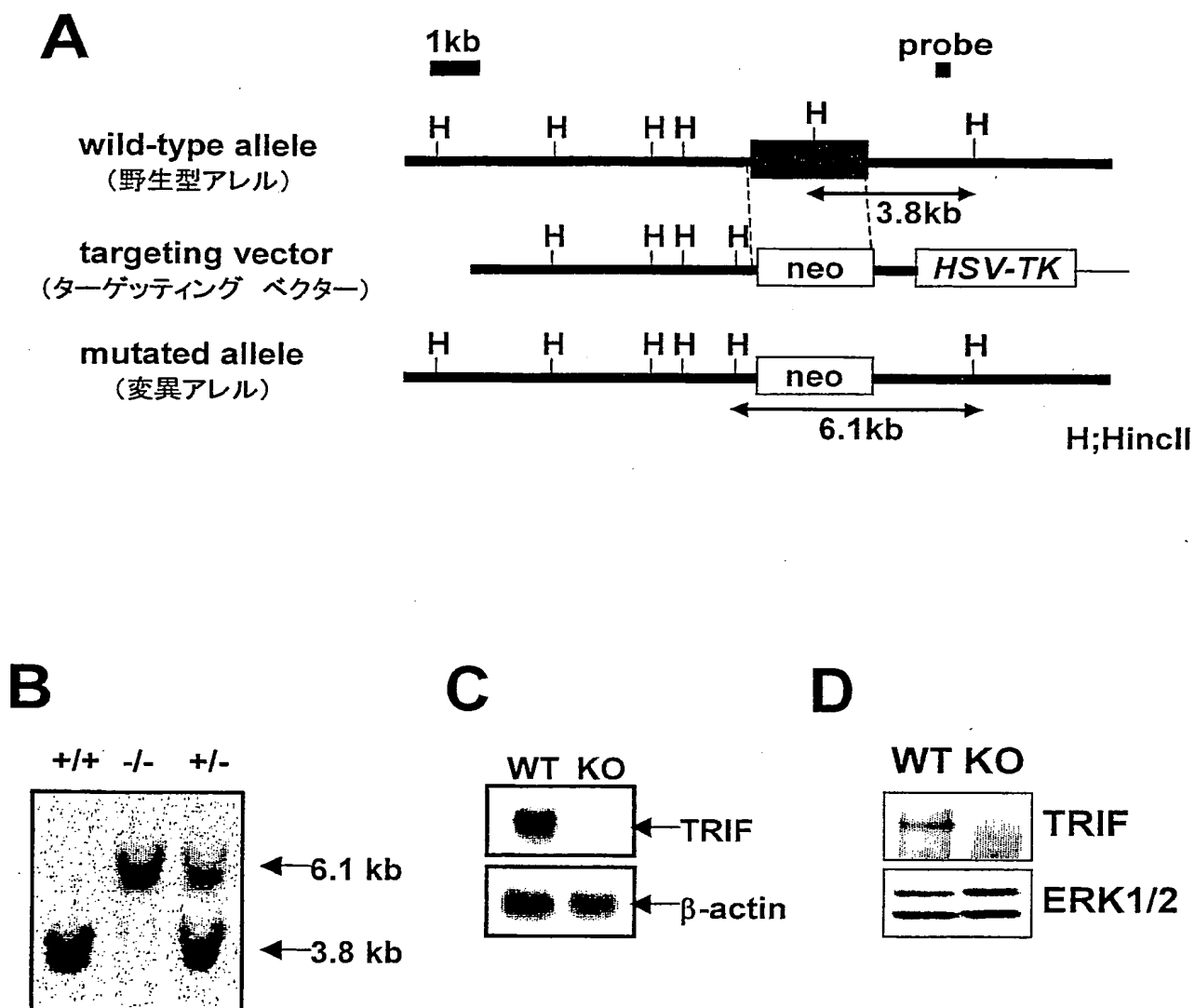
## 第 4 図



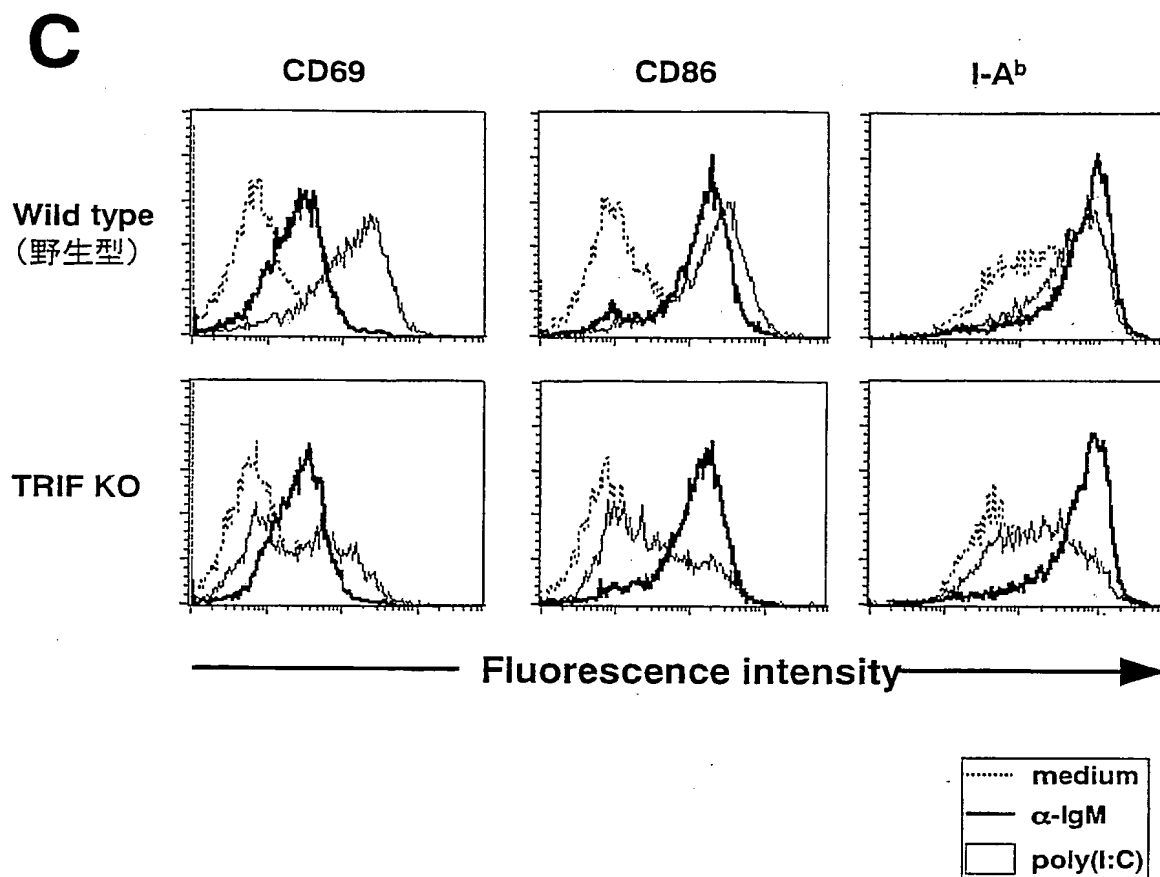
## 第 4 図 (つづき)

**e****f**

## 第 6 図

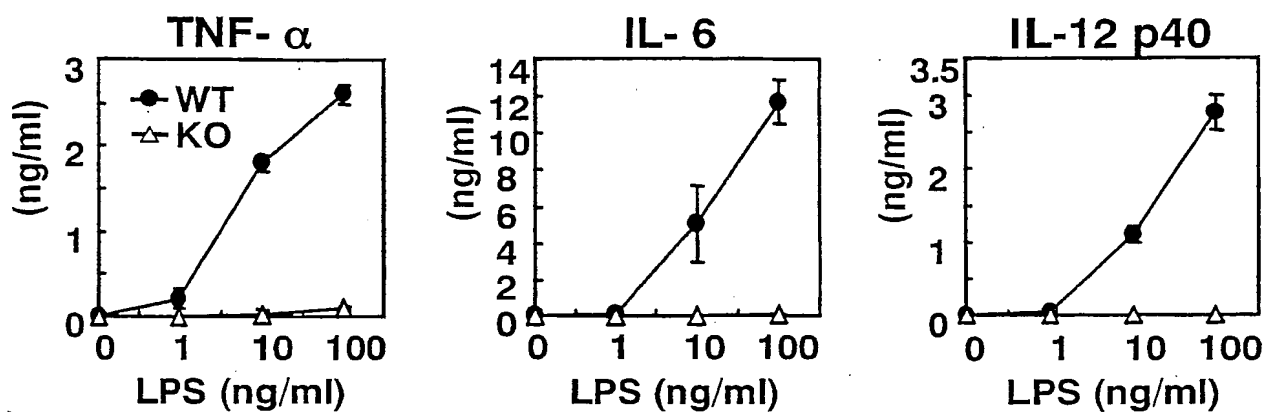


## 第 7 図 (つづき)

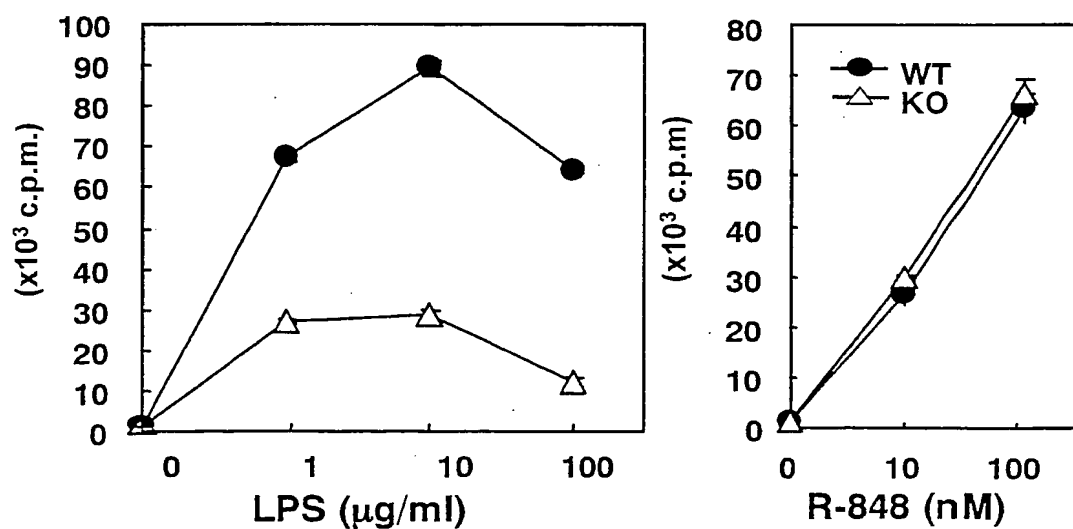


## 第 8 図 (つづき)

C



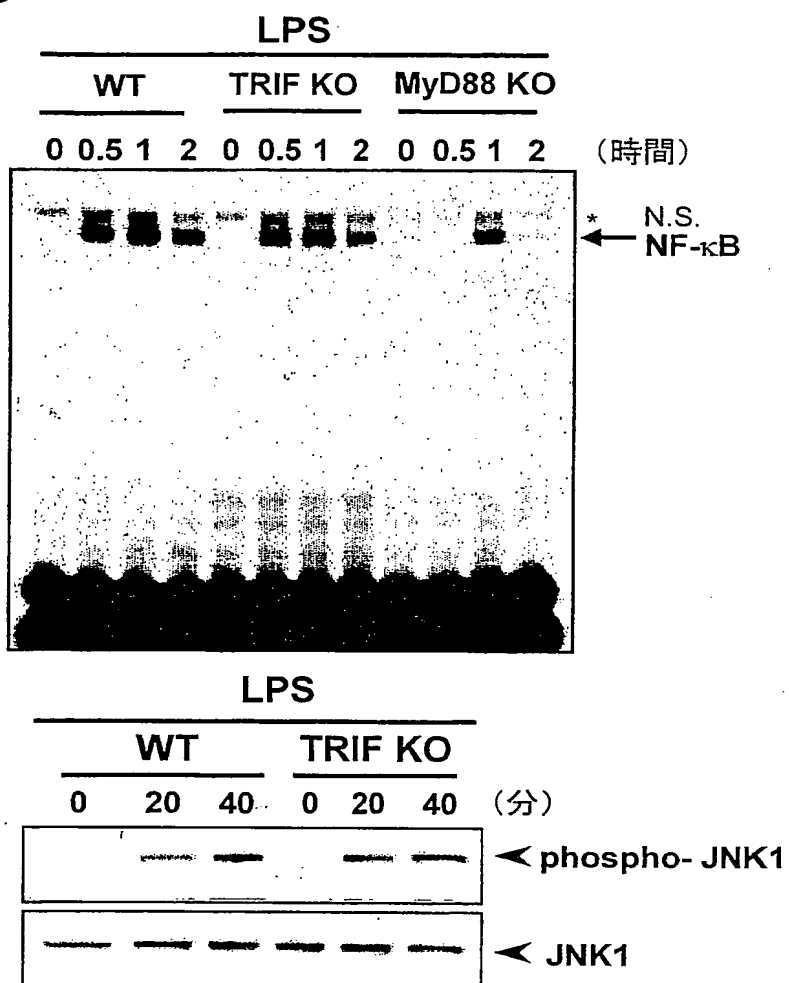
D



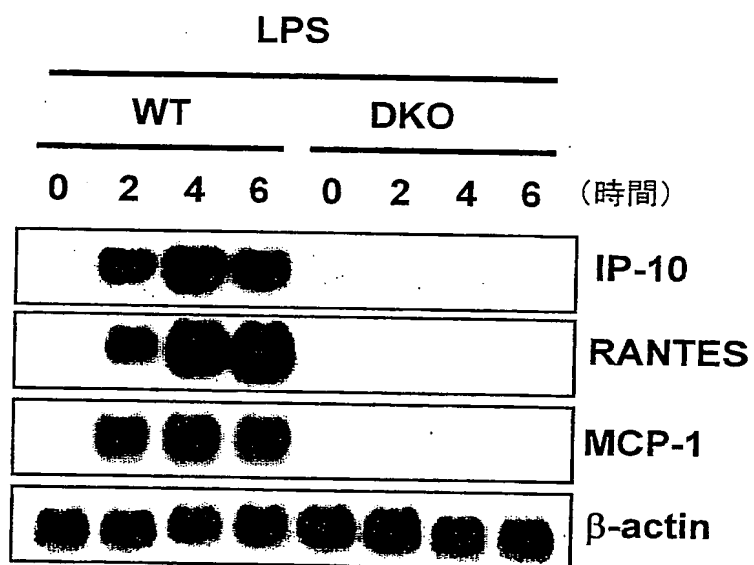
# A



## 第 9 図 (つづき)

**D**

## 第 9 図 (つづき)

**F**



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2136)

&lt;400&gt; 1

atg gcc tgc aca ggc cca tca ctt cct agc gcc ttc gac att cta ggt 48

Met Ala Cys Thr Gly Pro Ser Leu Pro Ser Ala Phe Asp Ile Leu Gly

1 5 10 15

gca gca ggc cag gac aag ctc ttg tat ctg aag cac aaa ctg aag acc 96

Ala Ala Gly Gln Asp Lys Leu Leu Tyr Leu Lys His Lys Leu Lys Thr

20 25 30

cca cgc cca ggc tgc cag ggg cag gac ctc ctg cat gcc atg gtt ctc 144

Pro Arg Pro Gly Cys Gln Gly Gln Asp Leu Leu His Ala Met Val Leu

35 40 45

ctg aag ctg ggc cag gaa act gag gcc agg atc tct cta gag gca ttg 192

Leu Lys Leu Gly Gln Glu Thr Glu Ala Arg Ile Ser Leu Glu Ala Leu

50 55 60

aag gcc gat gcg gtg gcc cgg ctg gtg gcc cgc cag tgg gct ggc gtg 240

Lys Ala Asp Ala Val Ala Arg Leu Val Ala Arg Gln Trp Ala Gly Val

65 70 75 80

gac agc acc gag gac cca gag gag ccc cca gat gtg tcc tgg gct gtg 288

Asp Ser Thr Glu Asp Pro Glu Glu Pro Pro Asp Val Ser Trp Ala Val

Ser Leu Arg Ser Thr Gly Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ser Asn Leu Glu  
 195 200 205

atc agc cag tcc cct acc atg ccc ttc ctc agc ctg cac cgc agc cca 672  
 Ile Ser Gln Ser Pro Thr Met Pro Phe Leu Ser Leu His Arg Ser Pro  
 210 215 220

cat ggg ccc agc aag ctc tgi gac gac ccc cag gcc agc ttg gtg ccc 720  
 His Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asp Asp Pro Gln Ala Ser Leu Val Pro  
 225 230 235 240

gag cct gtc ccc ggt ggc tgc cag gag cct gag gag atg agc tgg ccg 768  
 Glu Pro Val Pro Gly Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Met Ser Trp Pro  
 245 250 255

cca tgc ggg gag att gcc agc cca cca gag ctg cca agc agc cca cct 816  
 Pro Ser Gly Glu Ile Ala Ser Pro Pro Glu Leu Pro Ser Ser Pro Pro  
 260 265 270

cct ggg ctt ccc gaa gtg gcc cca gat gca acc tcc act ggc ctc cct 864  
 Pro Gly Leu Pro Glu Val Ala Pro Asp Ala Thr Ser Thr Gly Leu Pro  
 275 280 285

gat acc ccc gca gct cca gaa acc agc acc aac tac cca gtg gag tgc 912  
 Asp Thr Pro Ala Ala Pro Glu Thr Ser Thr Asn Tyr Pro Val Glu Cys  
 290 295 300

gag gcc ctt ggc gig ccc gac ggg gcc acc ttc tgc gag gat ttc cag 1296

Glu Ala Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Asp Phe Gln

420

425

430

gtg ccg ggg cgc ggg gag ctg agc tgc ctg cag gac gcc ata gac cac 1344

Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu Ser Cys Leu Gln Asp Ala Ile Asp His

435

440

445

tca gct ttc atc atc cta ctt ctg acc tcc aac ttc gac tgt cgc ctg 1392

Ser Ala Phe Ile Ile Leu Leu Leu Thr Ser Asn Phe Asp Cys Arg Leu

450

455

460

agc ctg cac cag gtg aac caa gcc atg atg agc aac ctc acg cga cag 1440

Ser Leu His Gln Val Asn Gln Ala Met Met Ser Asn Leu Thr Arg Gln

465

470

475

480

ggg tcg cca gac tgt gtc atc ccc ttc ctg ccc ctg gag agc tcc ccg 1488

Gly Ser Pro Asp Cys Val Ile Pro Phe Leu Pro Leu Glu Ser Ser Pro

485

490

495

gcc cag ctg agc tcc gac acg gcc agc ctg ctg tcc ggg ctg gtg cgg 1536

Ala Gln Leu Ser Ser Asp Thr Ala Ser Leu Leu Ser Gly Leu Val Arg

500

505

510

ctg gac gaa cac tcc cag atc ttc gcc agg aag gtg gcc aac acc ttc 1584

Leu Asp Glu His Ser Gln Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn Thr Phe

Pro Gly Cys Pro Gln Pro Pro Pro Leu His Ala Trp Gln Ala Gly Thr

625 630 635 640

ccc cca ccg ccc tcc cca cag cca gca gcc ttt cca cag tca ctg ccc 1968

Pro Pro Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Ala Phe Pro Gln Ser Leu Pro

645 650 655

ttc ccg cag tcc cca gcc ttc cct acg gcc tca ccc gca ccc cct cag 2016

Phe Pro Gln Ser Pro Ala Phe Pro Thr Ala Ser Pro Ala Pro Pro Gln

660 665 670

agc cca ggg ctg caa ccc ctg att atc cac cac gca cag atg gta cag 2064

Ser Pro Gly Leu Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val Gln

675 680 685

ctg ggg ctg aac aac cac atg tgg aac cag aga ggg tcc cag gcg ccc 2112

Leu Gly Leu Asn Asn His Met Trp Asn Gln Arg Gly Ser Gln Ala Pro

690 695 700

gag gac aag acg cag gag gca gaa tga 2139

Glu Asp Lys Thr Gln Glu Ala Glu

705 710

<210> 2

<211> 712

<212> PRT

Asp Asp His Arg Leu Gly Glu Leu Gln Asp Glu Ala Arg Asn Arg Cys  
130 135 140

Gly Trp Asp Ile Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ile Arg Thr Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Asn Leu Gly Cys Leu Pro Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Gly Thr Arg  
165 170 175

Ser Leu Pro Arg Pro Ile Asp Gly Val Ser Asp Trp Ser Gln Gly Cys  
180 185 190

Ser Leu Arg Ser Thr Gly Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ser Asn Leu Glu  
195 200 205

Ile Ser Gln Ser Pro Thr Met Pro Phe Leu Ser Leu His Arg Ser Pro  
210 215 220

His Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asp Asp Pro Gln Ala Ser Leu Val Pro  
225 230 235 240

Glu Pro Val Pro Gly Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Met Ser Trp Pro  
245 250 255

Pro Ser Gly Glu Ile Ala Ser Pro Pro Glu Leu Pro Ser Ser Pro Pro  
260 265 270

Glu Ala Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Asp Phe Gln

420

425

430

Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu Ser Cys Leu Gln Asp Ala Ile Asp His

435

440

445

Ser Ala Phe Ile Ile Leu Leu Leu Thr Ser Asn Phe Asp Cys Arg Leu

450

455

460

Ser Leu His Gln Val Asn Gln Ala Met Met Ser Asn Leu Thr Arg Gln

465

470

475

480

Gly Ser Pro Asp Cys Val Ile Pro Phe Leu Pro Leu Glu Ser Ser Pro

485

490

495

Ala Gln Leu Ser Ser Asp Thr Ala Ser Leu Leu Ser Gly Leu Val Arg

500

505

510

Leu Asp Glu His Ser Gln Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn Thr Phe

515

520

525

Lys Pro His Arg Leu Gln Ala Arg Lys Ala Met Trp Arg Lys Glu Gln

530

535

540

Asp Thr Arg Ala Leu Arg Glu Gln Ser Gln His Leu Asp Gly Glu Arg

545

550

555

560

Glu Asp Lys Thr Gln Glu Ala Glu

705

710

<210> 3

<211> 2199

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2199)

<400> 3

aig gat aac cca ggg cct icg ctc cgt ggt gcc ttt ggc att cta ggt 48

Met Asp Asn Pro Gly Pro Ser Leu Arg Gly Ala Phe Gly Ile Leu Gly

1

5

10

15

gcc tlg gaa agg gac agg ctg acc cac ctg aaa cac aag ctg ggg agt 96

Ala Leu Glu Arg Asp Arg Leu Thr His Leu Lys His Lys Leu Gly Ser

20

25

30

ctg tgt tca ggc agc cag gag tca aag ctt ctc cat gcc atg gta ctc 144

Leu Cys Ser Gly Ser Gln Glu Ser Lys Leu Leu His Ala Met Val Leu

35

40

45

cat cag ggi tcc cig cag cca cct tca gca tcc cct gca gig acc aga 528  
His Gln Gly Ser Leu Gln Pro Pro Ser Ala Ser Pro Ala Val Thr Arg  
165 170 175

agc cag cct cgt ccc att gac aca cca gac tgg agt tgg gga cat acg 576  
Ser Gln Pro Arg Pro Ile Asp Thr Pro Asp Trp Ser Trp Gly His Thr  
180 185 190

tta cac tcc acc aac agc act gcc tca ctg gcc agc cac cta gag atc 624  
Leu His Ser Thr Asn Ser Thr Ala Ser Leu Ala Ser His Leu Glu Ile  
195 200 205

agc cag tca ccc act ctt gcc tit ctg tct tca cac cat gga acc cat 672  
Ser Gln Ser Pro Thr Leu Ala Phe Leu Ser Ser His His Gly Thr His  
210 215 220

ggg ccc agc aag cta tgt aac aca ccg ctg gac act cag gag cct cag 720  
Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asn Thr Pro Leu Asp Thr Gln Glu Pro Gln  
225 230 235 240

ctt gtc cct gaa ggc tgc caa gaa cct gag gag ata agc tgg cct cca 768  
Leu Val Pro Glu Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Ile Ser Trp Pro Pro  
245 250 255

tca gtg gag acc agt gtc tcc ita ggg ita cca cac gaa att agc gtt 816  
Ser Val Glu Thr Ser Val Ser Leu Gly Leu Pro His Glu Ile Ser Val



Ala Ser Ser Pro Ser Ser Tyr Pro Ala Pro Pro Thr Ser Thr Ser Pro

370

375

380

gtt ttg gac cac tca gaa aca tct gat cag aaa ttc tat aac ttt gtg 1200

Val Leu Asp His Ser Glu Thr Ser Asp Gln Lys Phe Tyr Asn Phe Val

385

390

395

400

gtt atc cat gcc agg gct gat gaa cag gtg gcc cta cgt att cgg gag 1248

Val Ile His Ala Arg Ala Asp Glu Gln Val Ala Leu Arg Ile Arg Glu

405

410

415

aag ctg gag acc ctc ggg gta cct gac ggg gcc acc ttc tgt gag gaa 1296

Lys Leu Glu Thr Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Glu

420

425

430

ttt cag gtg ccc ggg cgt ggt gag ctg cac tgt ctc caa gat gcc atc 1344

Phe Gln Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu His Cys Leu Gln Asp Ala Ile

435

440

445

gat cac tcg ggg ttc acg atc ctg ctc ctg act gct agc ttt gat tgc 1392

Asp His Ser Gly Phe Thr Ile Leu Leu Leu Thr Ala Ser Phe Asp Cys

450

455

460

agc ctg agc ctg cat caa atc aac cat gct ctc atg aac agc ctt aca 1440

Ser Leu Ser Leu His Gln Ile Asn His Ala Leu Met Asn Ser Leu Thr

465

470

475

480

iii ggg aag aac tlg tca ctg ggg act cca aca ccc agc tgg ccc gga 1824

Phe Gly Lys Asn Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Pro Ser Trp Pro Gly

595

600

605

tgt cca cag cca ala cct tct cat cct cag ggt ggt act cca gtt ttc 1872

Cys Pro Gln Pro Ile Pro Ser His Pro Gln Gly Gly Thr Pro Val Phe

610

615

620

ccc tat tcc cca cag cct cca tcc ttc cct cag cct cca tgc ttc cct 1920

Pro Tyr Ser Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Cys Phe Pro

625

630

635

640

cag cct cca tcc ttc cct cag cct cca tcc ttc cca ctg cct cca gtc 1968

Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Leu Pro Pro Val

645

650

655

tct tcc cca cag tcc caa tcc ttt cca tca gcc tcc tcc cca gcc cca 2016

Ser Ser Pro Gln Ser Gln Ser Phe Pro Ser Ala Ser Ser Pro Ala Pro

660

665

670

cag act cca gga cct cag cct ctc att att cac cat gcc cag atg gtt 2064

Gln Thr Pro Gly Pro Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val

675

680

685

cag ctg ggt gtc aac aat cac atg tgg ggc cac aca ggg gcc cag tca 2112

Gln Leu Gly Val Asn Asn His Met Trp Gly His Thr Gly Ala Gln Ser

Glu Thr Thr Glu Gly Pro Glu Glu Pro Pro Asp Leu Ser Trp Thr Val  
                             85                            90                            95  
 Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Asn Leu Cys Pro Ala Ser  
                             100                            105                            110  
 Thr Arg Asp Met Ala Tyr Gln Val Ala Leu Arg Asp Phe Ala Ser Gln  
                             115                            120                            125  
 Gly Asp His Gln Leu Gly Gln Leu Gln Asn Glu Ala Trp Asp Arg Cys  
                             130                            135                            140  
 Ser Ser Asp Ile Lys Gly Asp Pro Ser Gly Phe Gln Pro Leu His Ser  
 145                            150                            155                            160  
 His Gln Gly Ser Leu Gln Pro Pro Ser Ala Ser Pro Ala Val Thr Arg  
                             165                            170                            175  
 Ser Gln Pro Arg Pro Ile Asp Thr Pro Asp Trp Ser Trp Gly His Thr  
                             180                            185                            190  
 Leu His Ser Thr Asn Ser Thr Ala Ser Leu Ala Ser His Leu Glu Ile  
                             195                            200                            205  
 Ser Gln Ser Pro Thr Leu Ala Phe Leu Ser Ser His His Gly Thr His  
                             210                            215                            220  
 Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asn Thr Pro Leu Asp Thr Gln Glu Pro Gln  
 225                            230                            235                            240  
 Leu Val Pro Glu Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Ile Ser Trp Pro Pro  
                             245                            250                            255  
 Ser Val Glu Thr Ser Val Ser Leu Gly Leu Pro His Glu Ile Ser Val  
                             260                            265                            270  
 Pro Glu Val Ser Pro Glu Glu Ala Ser Pro Ile Leu Pro Asp Ala Leu  
                             275                            280                            285  
 Ala Ala Pro Asp Thr Ser Val His Cys Pro Ile Glu Cys Thr Glu Leu

Val Trp Leu Asp Glu His Ser Pro Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn  
 515 520 525  
 Thr Phe Lys Thr Gln Lys Leu Gln Ala Gln Arg Val Arg Trp Lys Lys  
 530 535 540  
 Ala Gln Glu Ala Arg Thr Leu Lys Glu Gln Ser Ile Gln Leu Glu Ala  
 545 550 555 560  
 Glu Arg Gln Asn Val Ala Ala Ile Ser Ala Ala Tyr Thr Ala Tyr Val  
 565 570 575  
 His Ser Tyr Arg Ala Trp Gln Ala Glu Met Asn Lys Leu Gly Val Ala  
 580 585 590  
 Phe Gly Lys Asn Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Pro Ser Trp Pro Gly  
 595 600 605  
 Cys Pro Gln Pro Ile Pro Ser His Pro Gln Gly Gly Thr Pro Val Phe  
 610 615 620  
 Pro Tyr Ser Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Cys Phe Pro  
 625 630 635 640  
 Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Leu Pro Pro Val  
 645 650 655  
 Ser Ser Pro Gln Ser Gln Ser Phe Pro Ser Ala Ser Ser Pro Ala Pro  
 660 665 670  
 Gln Thr Pro Gly Pro Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val  
 675 680 685  
 Gln Leu Gly Val Asn Asn His Met Trp Gly His Thr Gly Ala Gln Ser  
 690 695 700  
 Ser Asp Asp Lys Thr Glu Cys Ser Glu Asn Pro Cys Met Gly Pro Leu  
 705 710 715 720  
 Thr Asp Gln Gly Glu Pro Leu Leu Glu Thr Pro Glu

promoter

<400> 6

agcttgaata aaatgaatat tagaagcigt tagaataaga gaaaatgaca gaggaaaact 60  
gaaagggaga actgaaagtg ggaaatccct ctgaggcaga aaggaccaic cctatataat 120  
agcacaggcc atgaaggaag atcattctca ctgcagcctt tgacagcctt tgcctcatct 180  
tg 182

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14475

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	OSHIUMI, H. et al., TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction, Nat.Immunol., 2003 February, Vol.4, No.2, pages 161 to 167	1-24
P, X	YAMAMOTO, M. et al., Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling, J.Immunol., 15 December, 2002 (15.12.02), Vol.169, No.12, pages 6668 to 6672	1-24

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	OSHIUMI, H. et al., TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction, Nat Immunol, 2003 Feb, Vol. 4, No. 2, pp. 161-167	1-24
P, X	YAMAMOTO, M. et al., Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling, J Immunol, 2002 Dec 15, Vol. 169, No. 12, pp. 6668-6672	1-24

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**